

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/18, C07K 13/00 A61K 37/36, C12N 1/21	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 90/05185 (43) Date de publication internationale: 17 mai 1990 (17.05.90)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/EP89/01399 (22) Date de dépôt international: 7 novembre 1989 (07.11.89) (30) Données relatives à la priorité: 88/14514 7 novembre 1988 (07.11.88) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): L'UNIVERSITE DE L'ETAT A LIEGE [BE/BE]; 7, place du 20-Août, B-4000 Liège (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : MARTIAL, Joseph [BE/BE]; 13, rue Vignoble, B-4050 Esneux (BE); LE-COMTE, Corine [BE/BE]; 15, rue de la Croix, B-5292 Ocquier (BE). (74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc. ; SC Ernest Gutmann Yves Plasseraud, 67, bd Haussmann, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: MODIFIED HUMAN GROWTH HORMONE (54) Titre: HORMONE DE CROISSANCE HUMAINE MODIFIEE (57) Abstract <p>Protein derived from human growth hormone (hGH), which no longer has the first two amino acids of the natural hypophysial hormone at the terminal end of the amino acid, retaining its main biological activity of bone and somatic growth stimulation, but no longer having the transitory and diabetogenic insulin effects generally observed when administering hGH. Said modified growth hormone protein can be used for therapeutic purposes, in particular for treating clinical cases where the effects of the growth hormone sugars on the metabolism are to be avoided: patients suffering from cachexia, new-born babies and the elderly.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne une protéine dérivée de l'hormone de croissance humaine, qui n'a plus les deux premiers acides aminés de l'hormone hypophysaire naturelle à l'extrémité amino terminale, retenant son activité biologique principale de stimulation de la croissance osseuse et somatique, mais ne témoignant plus des effets insuliniques transitoires et diabétogènes généralement observés lors de l'administration de hGH. Cette protéine d'hormone de croissance modifiée est utilisable en thérapeutique, en particulier pour le traitement de cas cliniques pour lesquels les effets sur le métabolisme des sucres de l'hormone de croissance sont à éviter: patients cachectiques, nouveau-nés et personnes âgées.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Fasso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NO	Norvège
BJ	Bénin	IT	Italie	RO	Roumanie
BR	Brésil	JP	Japon	SD	Soudan
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

HORMONE DE CROISSANCE HUMAINE MODIFIEE

L'invention concerne une protéine dérivée de l'hormone de croissance humaine (ci-après désignée sous l'abréviation hGH), qui n'a plus les deux premiers acides aminés à l'extrémité amino terminale et qui retient son activité biologique principale de stimulation de la croissance osseuse et somatique, mais qui ne témoigne plus des effets insuliniques transitoires et diabétogènes généralement observés lors de l'administration de hGH.

A titre d'arrière plan on rappelle que l'hormone de croissance est une protéine synthétisée et sécrétée par les cellules somatotropes du lobe antérieur de l'hypophyse. Le rôle important de cette hormone dans la croissance humaine est bien connu et en thérapeutique elle est capable de combler le déficit hypophysaire responsable de certaines formes de nanisme. L'hormone de croissance humaine est une molécule polypeptidique de 191 acides aminés et de 22000 daltons de poids moléculaire, possédant deux ponts disulfure entre les résidus 53 et 165 d'une part, et 182 et 189 d'autre part (Figure 1).

L'hormone de croissance humaine se caractérise par la multiplicité de ses activités biologiques. Sa propriété majeure est de stimuler la croissance osseuse et somatique par une augmentation de la chondrogenèse, de la synthèse des protéines et de la prolifération des cellules. Ces effets somatogéniques sont médiés par des facteurs de croissance (somatomédines ou facteurs IGF "Insulin-like Growth

Factors"), sécrétés sous l'influence de hGH essentiellement au niveau du foie. De plus, l'hormone de croissance exerce une gamme étendue d'effets métaboliques que l'on peut résumer comme suit:

- l'effet "diabétoène", effet anti-insulinique agissant sur le métabolisme des hydrates de carbone, correspond à une réduction de l'assimilation du glucose, associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline. Cet effet est observé soit dans le cas d'une sécrétion excessive de hGH (acromégalie), soit lorsque celle-ci est administrée peu avant une surcharge en glucose ou de manière chronique à un sujet diabétique (Levine et Luft, 1964). Cet effet anti-insulinique de la hGH se manifeste également au niveau du métabolisme des lipides, aboutissant à une stimulation de la lipolyse (effet lipolytique) : l'hormone de croissance favorise en effet la mobilisation des lipides vers le foie - sous forme d'acides gras - et stimule leur oxydation par rapport à celle des acides aminés et des sucres (Fain et al., 1965; Goodman, 1968).

- chez un sujet insuffisant hypophysaire ou carencé en hormone de croissance, l'administration de hGH humaine exerce un effet transitoire de type insulinique entraînant une hypoglycémie passagère (Merimee, 1972; Goodman, 1981). Comme l'insuline, la hGH est capable dans ce cas d'augmenter l'entrée et l'utilisation de glucose dans les muscles (Park et al., 1952) et dans les cellules adipeuses (Goodman, 1967), de même qu'elle montre un effet anti-lipolytique important (Birnbaum et Goodman, 1976). L'ensemble de ces effets ne dure cependant que quelques heures, après quoi les tissus deviennent réfractaires à cet effet insulinique de l'hormone de croissance et deviennent en revanche sensibles à son effet anti-insulinique décrit précédemment.

Bien que les effets diabétogènes et insuliniques se manifestent de manière différente, on peut supposer qu'ils ont un dénominateur biologique et moléculaire commun. La Figure 2 résume schématiquement les modes d'action de la hGH ainsi que le système global de régulation de sa sécrétion à partir de l'antéhypophyse.

Actuellement, deux types d'hormones de croissance recombinantes, produites à partir de gènes clonés et exprimés dans des microorganismes, sont utilisées en thérapeutique pour le traitement de différentes formes de déficiences hypophysaires : la hGH, hormone recombinante authentique, qui est identique à l'hormone naturelle isolée d'extraits hypophysaires et la met-hGH, hormone recombinante possédant une méthionine additionnelle à son extrémité amino terminale. Ces deux protéines recombinantes ont des propriétés tout à fait identiques à celles de l'hormone naturelle, indiquant que l'activité lipolytique et diabétogène, et l'effet insulinique transitoire, sont des propriétés intrinsèques de l'hormone de croissance humaine. Le développement d'hormones de croissance dépourvues d'activité diabétogène aurait des intérêts thérapeutiques très importants pour le traitement de certains cas cliniques pour lesquels les effets métaboliques de la hGH sur la tolérance aux carbohydrates sont à éviter: patients cachectiques, nouveaux-nés, personnes âgées.

Dans cette invention, on démontre qu'une modification de la structure primaire de la hGH notamment par voie génétique, résulte en une hGH modifiée témoignant d'activités biologiques différentes et de propriétés améliorées par rapport à l'hormone naturelle ou aux hormones recombinantes.

L'invention a pour objet une hormone de croissance humaine modifiée témoignant d'une activité de stimulation de croissance somatidique caractérisée

- en ce qu'elle comporte une délétion des n premiers acides aminés N-terminaux de l'hormone de croissance humaine naturelle, n étant supérieur ou égal à 2 et n'allant pas au-delà de ce qui entraîne une modification de l'activité de stimulation de croissance somatidique par rapport à l'hormone de croissance naturelle humaine,

- et en ce qu'elle est dépourvue soit d'activité diabétogène, soit d'activité insulinique, agissant au niveau du métabolisme des carbohydrates, ou des deux activités à la fois,

- sous réserve que n soit différent de 13.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'hormone de croissance est caractérisée en ce que le nombre n d'acides aminés délétés ne va pas au-delà de ce qui entraîne une modification de la configuration tridimensionnelle naturelle par rapport à l'hormone de croissance humaine naturelle.

L'invention a pour objet une hormone de croissance modifiée caractérisée en ce qu'elle comporte une délétion des n premiers acides aminés N-terminaux de l'hormone de croissance humaine, n prenant l'une quelconque des valeurs 2 à 24, et étant différent de 13.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'hormone de croissance humaine est caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 15, par exemple 15.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'hormone de croissance humaine est caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 14, par exemple 14.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'hormone de croissance humaine est caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 12, par exemple 12.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'hormone de croissance humaine est caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 9, par exemple 9.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'hormone de croissance humaine est caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 7, par exemple 7.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'hormone de croissance humaine est caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 5, par exemple 5.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'hormone de croissance humaine est caractérisée en ce que n est égal à 2.

Dans la mise en oeuvre préférée de l'invention, l'élimination des deux premiers acides aminés de la hGH naturelle a été réalisée par génie génétique en rabottant les deux premiers codons du gène hGH. Ceci résulte en une protéine hGH modifiée retenant toute son activité de stimulation de croissance mais dépourvue d'effets secondaires sur le métabolisme des carbohydrates.

L'invention concerne également les ADN recombinants codant pour l'hormone de croissance modifiée de l'invention définie ci-dessus.

L'invention concerne aussi le procédé de production d'une protéine hGH modifiée conforme à l'invention. Il comprend notamment : la culture d'un hôte cellulaire compétent, auparavant transformé avec un acide nucléique contenant une séquence de nucléotides codant pour la protéine hGH modifiée

elle-même placée sous le contrôle d'éléments de régulation, dont notamment un promoteur reconnu par les polymérases de cet hôte cellulaire compétent, les éléments d'initiation et de terminaison de la traduction, et la récupération de la protéine modifiée produite à partir des produits d'expression de cet hôte cellulaire.

Appartiennent également à l'invention, les acides nucléiques décrits ci-dessus, précédés d'une séquence nucléotidique comprenant les éléments de régulation y inclus le promoteur sous le contrôle duquel s'effectue la transcription de la séquence du gène hGH modifiée et les éléments initiateurs et terminateurs de la traduction.

L'invention concerne aussi les vecteurs recombinants de ce type, cosmides, plasmides, phages modifiés par un acide nucléique codant pour la hGH modifiée en l'un de leurs sites non essentiels pour leur répllication.

Plus particulièrement, l'invention concerne les vecteurs modifiés par un insérat consistant en l'un des ADN recombinants définis ci-dessus, sous le contrôle d'un promoteur et des éléments de régulation appropriés permettant l'expression de cet ADN recombinant dans un hôte cellulaire compétent transformé par ledit vecteur recombinant.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le vecteur recombinant ci-dessus est un vecteur d'expression contenant, en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication, des éléments nécessaires pour promouvoir l'expression, dans un hôte cellulaire, d'un acide nucléique codant pour la hGH modifiée de l'invention, un promoteur compatible avec ledit hôte cellulaire, en particulier un promoteur inductible.

L'invention se rapporte encore aux hôtes cellulaires transformés par un vecteur recombinant tel que décrit plus haut, vecteur capable de se répliquer dans ledit microorganisme et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence nucléique codant pour la protéine modifiée de l'invention dans cet hôte.

Un premier hôte cellulaire préféré est constitué par E.coli transformé par un vecteur recombinant tel qu'il sera décrit dans les exemples qui suivent.

L'invention concerne encore plus particulièrement des cultures cellulaires transformées dans les conditions sus-indiquées et aptes à synthétiser la hGH modifiée selon l'invention.

L'invention concerne les compositions pharmaceutiques contenant comme principe actif l'hormone de croissance humaine modifiée de l'invention.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont appropriées :

- au traitement du déficit hypophysaire ou des carences en hormones de croissance,
- au traitement des retards ou des insuffisances de croissance,
- au traitement de l'obésité,
- au traitement de cicatrices après accident ou opération,
- au traitement des phénomènes de vieillissement.

L'invention concerne également l'utilisation de l'hormone de croissance de l'invention, à la préparation de médicaments destinés au traitement du déficit hypophysaire ou des carences en hormone de croissance, au traitement des retards ou des insuffisances de croissance, au traitement de l'obésité, au traitement de cicatrices après accident ou opération, au traitement des phénomènes de

vieillissement, sans présenter d'effet diabétogène et/ou d'effet insulinique, notamment chez les patients cachexiques, les vieillards ou les nouveaux-nés.

L'invention concerne également l'utilisation de l'hormone de croissance comportant une délétion des 13 premiers acides aminés N-terminaux de l'hormone de croissance humaine naturelle, à la préparation de médicaments destinés au traitement du déficit hypophysaire ou des carences en hormone de croissance, au traitement des retards ou des insuffisances de croissance, au traitement de l'obésité, au traitement de cicatrices après accident ou opération, au traitement des phénomènes de vieillissement, sans présenter d'effet diabétogène et/ou d'effet insulinique, chez les patients cachexiques, les vieillards ou les nouveaux-nés.

L'invention concerne également une méthode pour améliorer l'aspect physique d'un être humain présentant des cicatrices, comprenant l'administration de l'hormone de croissance de l'invention, en quantité propre à régénérer les tissus et le renouvellement de la dose administrée jusqu'à l'obtention de l'atténuation ou de la disparition des cicatrices, améliorant l'esthétique du sujet.

L'invention concerne également l'application à titre de produit cosmétique de l'hormone de croissance de l'invention.

L'invention concerne également les compositions cosmétiques contenant l'hormone de croissance de l'invention.

L'application cosmétique des produits de l'invention résulte des propriétés de régénération tissulaire de l'hormone de croissance modifiée de l'invention, que ce soit dans l'atténuation ou la disparition des cicatrices ou la lutte contre les effets du vieillissement, tels que les rides.

RESULTATS

Clonage et expression du gène hGH codant pour une protéine hGH modifiée

On clone le gène codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) à partir de tumeurs hypophysaires de patients acromégales, qui sont riches en RNA messenger hGH. Après avoir extrait les RNA totaux de tumeurs individuelles, on a purifié les RNA messagers par chromatographie d'affinité sur oligo [dT]-cellulose. Les échantillons les plus riches en messagers codant pour la hGH, identifiés par des tests de traduction acellulaire, ont ensuite été utilisés pour la synthèse de DNA complémentaire (cDNA), d'après la méthode de Goodman et MacDonald (1979). Le cDNA bicaténaire, fractionné sur Sepharose 4B, a été inséré dans la site EcoRI du vecteur lambda 641 en utilisant des oligonucléotides synthétiques contenant le site EcoRI. Après encapsidation *in vitro* du DNA recombinant, la bibliothèque de cDNA a été criblée à l'aide de sondes obtenues à partir du plasmide pchGH800 contenant le gène hGH (Martial et al., 1979). Les cDNA des clones positifs ont ensuite été clonés dans le plasmide pBR322, et la séquence des nucléotides des cDNA a été déterminée. Le cDNA du plasmide pDM 100 hGH dont la séquence est présentée dans la Figure 3, codant pour une hormone de croissance naturelle intacte a été utilisé dans la construction du gène hGH modifié.

Le système d'expression que on a utilisé pour exprimer le gène hGH modifié est un système procaryote, en deux cistrons: le premier cistron est constitué par le cDNA codant pour la Cu/Zn superoxyde dismutase humaine (hSOD), le deuxième par le cDNA-hGH. Les deux gènes sont sous la dépendance d'un seul promoteur, en l'occurrence le promoteur tac.

La Figure 4a représente le vecteur pSOD utilisé. Ce plasmide est dérivé du vecteur ptac5 dans lequel a été cloné le cDNA codant pour la Cu/Zn superoxyde dismutase humaine ou hSOD (Hallewell et al., 1985). Il permet l'expression de cette protéine hSOD, sous la dépendance du promoteur tac (de Boer et al., 1983). La séquence originale du cDNA-hSOD a été modifiée à son extrémité 3' par l'insertion d'un polylinker dont la séquence est présentée dans la Figure 4b, et qui contient les sites de restriction Nco I et Sal I qui seront utilisés pour le clonage du cDNA hGH dans le vecteur pSOD.

On a construit le gène hGH modifié à partir d'un fragment Xba I - Sal I du cDNA hGH isolé du plasmide pDM100-hGH. Ce fragment de cDNA est long de 580 bp et son extrémité 5' correspond au deuxième nucléotide du codon de l'acide aminé 7 de la hGH. Il est représenté dans la partie b de la Figure 5. Le gène hGH modifié a été construit en ajoutant à ce fragment, du côté 5', un oligonucléotide synthétique représenté dans la partie a de la Figure 5, et dont la séquence comprend: une extrémité 5' compatible avec une extrémité Nco I; la séquence AGGA de Shine-Dalgarno; un codon TAA de terminaison de la traduction déterminant la fin du premier cistron; un codon ATG d'initiation de la traduction du deuxième messager; les codons pour les acides aminés 3, 4, 5 et 6 de la hGH; une extrémité 3' compatible avec une extrémité Xba I. Par conséquent, le gène hGH modifié résultant présente une délétion des deux premiers codons du gène hGH naturel, et un codon initiateur méthionine additionnel à l'extrémité 5'.

Après la ligation du DNA synthétique et du fragment CDNA-hGH, illustrée dans la Figure 5, on a obtenu un fragment de cDNA aux extrémités Nco I - Sal I, long de 610 bp, qui comprend la séquence codant

pour une protéine hGH délétée de ses deux premiers acides aminés et possédant une méthionine additionnelle à son extrémité NH₂ terminale. Ce fragment de cDNA a été inséré entre les sites Nco I et Sal I du vecteur pSOD à l'aide de la T4-DNA ligase, (Figure 6). Les clones recombinants obtenus après transformation des bactéries E.coli D1210, ont été détectés par hybridation avec une sonde spécifique radioactive dérivée du cDNA-hGH marqué au ³²P par transfert de coupure.

On a analysé les protéines totales exprimées dans les bactéries transformées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS après induction du promoteur tac. Dans les extraits de bactéries contenant le plasmide pSOD-hGH, on observe en comparaison avec un échantillon non induit, l'apparition de deux protéines supplémentaires: la hSOD et une deuxième protéine ayant la taille de celle attendue pour la hGH modifiée.

La deuxième étape dans la construction du vecteur d'expression de la hGH modifiée consistait à déléter le région interne du gène hSOD tout en gardant ses extrémités 5' et 3' intactes, ceci afin de ne pas affecter le niveau d'expression de la hGH modifiée. Pour cela, on a recherché, dans la séquence du cDNA-hSOD, 2 sites de restriction uniques ou peu fréquents permettant de déléter une partie de ce cDNA, sans en modifier la phase de lecture : le site Stu I au niveau du codon 41 du cDNA-hSOD, et le site Nco I au niveau du codon 153 du cDNA-hSOD. Après digestion du plasmide pSOD-hGH avec les enzymes Stu I et Nco I, suivi d'un traitement au fragment de Klenow de la DNA polymérase, le plasmide a été circularisé par l'action de la DNA ligase et transformé dans des bactéries E.coli D1210 (Figure 7). On a analysé les plasmides présents dans les clones de bactéries transformées et parmi 12

clones pris au hasard, 10 contenaient le plasmide délété, dénommé pSGHD.

Les protéines exprimées dans les clones contenant le plasmide pSGHD par électrophorèse des protéines totales exprimées dans ces clones ont été analysées. Ce test d'électrophorèse montre clairement que les bactéries qui possèdent le plasmide pSGHD ne produisent qu'une seule des deux protéines induites précédemment : celle dont la taille correspond à la taille attendue pour l'hormone de croissance humaine modifiée (Figure 8a). On a estimé le taux d'expression de l'hormone à 8% des protéines bactériennes totales. Ce rendement élevé d'expression permettra d'utiliser une procédure simplifiée pour purifier la protéine exprimée.

La purification partielle de la protéine hGH modifiée exprimée par le plasmide pSGHD a été réalisée en deux étapes : l'isolement et la solubilisation des corps d'inclusion d'une part, et leur purification par chromatographie HPLC d'autre part. En effet, on a observé que la protéine hGH modifiée produite après induction à l'IPTG, n'est pas soluble, mais est présente sous forme précipitée dans des corps d'inclusion. Ces corps d'inclusion sont constitués essentiellement d'hormone de croissance (Figure 8b) dont la solubilisation a été réalisée en les incubant à température ambiante dans une solution d'urée 8 M dissoute dans un tampon phosphate 50 mM pH 7.0. La solution est ensuite dialysée contre un grand volume de NH_4HCO_3 50 mM, puis lyophilisée. La deuxième étape de purification est une chromatographie HPLC sur résine échangeuse d'anions, DEAE. Cette chromatographie a été réalisée suivant les conditions établies pour la hGH d'origine extractive. Comme le montrent les résultats présentés dans la Figure 9,

cette procédure permet d'obtenir des fractions de protéine hGH modifiée suffisamment purifiée.

Caractérisation de la hGH modifiée:

Pour démontrer que la délétion des deux premiers acides aminés n'a pas d'influence sur la structure tridimensionnelle et l'activité biologique principale de stimulation de croissance somatogénique de la protéine hGH modifiée, on a effectué (1) des dosages radioimmunologiques en présence d'un anticorps polyclonal ou monoclonal spécifique de la hGH 22K hypophysaire, (2) des expériences de liaison à des préparations de récepteurs hépatiques isolés de foie de lapine gestante et (3) test d'activité somatogénique in vivo.

Dosages radioimmunologiques (RIA):

trois séries de dosages RIA ont été réalisées, différant par la nature de l'anticorps utilisé : un sérum de lapin dirigé contre l'hormone naturelle, un anticorps monoclonal dirigé contre son extrémité NH₂-terminale, et un second anticorps monoclonal dirigé contre une région interne de l'hormone. Les dosages ont été réalisés sur base de la compétition entre la protéine hGH modifiée et l'hormone de croissance hypophysaire marquée (¹²⁵I-hGH).

Les doses d'hormones hGH modifiées nécessaires pour déplacer de 50 % la fixation du traceur à l'anticorps (ED₅₀) ont été comparées à la dose d'hormone hypophysaire provoquant le même déplacement. On a ainsi évalué, pour chaque anticorps, les capacités de compétition de la protéine hGH modifiée vis-à-vis du traceur ¹²⁵I-hGH, exprimées en pourcentage de la capacité de compétition de l'hormone hypophysaire.

Ces dosages RIA montrent que la hGH modifiée purifiée est un bon compétiteur du traceur hypophysaire pour l'antisérum dirigé contre l'hormone

hypophysaire, et surtout pour le monoclonal dirigé contre une région interne de cette hormone : dans ce dernier cas, la protéine hGH modifiée possède en effet une capacité de compétition vis-à-vis du traceur équivalente à 80 % de celle du standard hGH. Par contre, la hGH modifiée n'entre pas du tout en compétition avec le traceur pour l'anticorps monoclonal NH₂-terminal. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné que la protéine hGH modifiée est déletée des acides aminés 1 et 2 de l'hormone naturelle.

Liaison à des récepteurs hépatiques:

il est bien établi que l'hormone de croissance agit principalement au niveau du foie, où elle stimule la synthèse des somatomédines et est impliquée dans la régulation de systèmes métaboliques tels que la gluconéogenèse et le métabolisme des acides gras. Le foie est donc un organe riche en récepteurs spécifiques de l'hormone de croissance, et particulièrement le foie de lapine gestante (Posner et al., 1974). Par conséquent, les récepteurs hépatiques utilisés pour les expériences de liaison sont préparés à partir de la fraction enrichie en membranes plasmiques et microsomiales du foie de lapine gestante. Le dosage par radiorécepteurs d'une hormone donnée consiste à incuber une faible quantité fixe d'hormone marquée (traceur) et de concentrations croissantes en hormone froide à doser. La quantité de traceur lié aux récepteurs est mesurée à l'équilibre, et est d'autant plus réduite que la concentration et l'affinité des hormones froides sont plus élevées. Les résultats obtenus montrent que la hGH a une capacité relative de 125 % par rapport à celle du standard international hGH à déplacer de 50 % (ED₅₀) la liaison initiale du traceur ¹²⁵I-hGH aux récepteurs hépatiques. La hGH modifiée montre donc une capacité

de déplacement supérieure à celle de l'hormone hypophysaire standard.

Activité somatogénique in vivo:

pour vérifier que la protéine hGH modifiée qui s'attache normalement aux récepteurs d'hormones somatogéniques du foie, retient bien son activité biologique principale de stimulation somatogénique on a utilisé un test : (1) le test du tibia (Greenspan et al., 1974).

Dans ce test du tibia, on a comparé de façon quantitative l'épaississement des cartilages de conjugaison induit par la hGH modifiée et le standard hGH international chez des jeunes rats hypophysectomés. Les résultats obtenus démontrent le même rapport linéaire entre l'épissage et le logarithme de la dose d'hormone pour les deux hormones.

Activité lactogénique in vivo:

Dans le test cellulaire NB2 (Tanaka T., Shiu R.P.C., Gout P.W., Beer C.T., Noble R.L., Friesen H.G. 1980 - Journal of Clinical Endocrinology and metabolism, vol. 51, p. 1058-1063), on a mesuré la stimulation de la croissance des cellules NB2 de rats en absence de sérum sous l'influence de la hGH modifiée et du standard international hGH. Les résultats ont clairement démontré que la hGH modifiée induisait une multiplication des cellules NB2 après 12h, 24h et 36h tout à fait comparable au standard hGH international.

En conclusion, ces tests démontrent que la protéine hGH modifiée a non seulement une conformation tridimensionnelle très similaire à celle de l'hormone hGH hypophysaire standard, mais retient toujours à 100% son activité biologique principale de stimulation de la croissance somatogénique.

Activité insulinique de la hGH modifiée:

L'activité insulinique transitoire de l'hormone de croissance humaine peut être mesurée in vitro par un test de stimulation de la lipogenèse, réalisé sur des adipocytes de rat provenant de tissus carencés en hGH. La présence d'hormone de croissance endogène induit en effet une résistance du tissu adipeux aux effets insuliniques de la hGH. Le test de l'activité insulinique de la hGH modifiée recombinante est basé sur la mesure de l'incorporation de flucoose tritié dans les lipides, en fonction de l'addition de doses croissantes en hGH, et est basé sur le test décrit (Moody et al., 1975) pour la stimulation de la lipogenèse par l'insuline. L'activité insulinique a été mesurée comme suit:

Préparation des adipocytes: les rats sont sacrifiés par dislocation des vertèbres cervicales et le tissu adipeux des reins et des épидидymes prélevé. Ce tissu, découpé en petits morceaux est immédiatement digéré à la collagénase (1 mg/ml) pendant 30 minutes à 37°C sous violente agitation, dans le tampon KRH pH 7.4 contenant 35 mg/ml BSA dialysée, et 0.27 mM de glucose, en utilisant 3 ml de tampon KRH par rat. Après filtration sur gaze, la suspension cellulaire est centrifugée à 600 g pendant 30 secondes et les adipocytes, de densité plus faible que le tampon remontent à la surface. L'infranageant est aspiré avec une seringue munie d'une longue aiguille et on remet les cellules en suspension dans le tampon frais. Les cellules sont lavées 5 fois dans du tampon KRH pH 7.4 à 37°C contenant 1 % BSA.

Stimulation de la lipogenèse : le protocole qui a été utilisé pour mesurer l'activité insulinique est adapté du test de stimulation de la lipogenèse par l'insuline, de Moody et al., (1975). Les adipocytes de rat sont d'abord réincubés pendant 4 heures à 37°C

dans le tampon KRH avec une concentration de BSA de 10 mg/ml, puis lavés et remis en suspension à une concentration de 0.8×10^5 cellules/ml. Le test est mené en triple dans des fioles de 10 ml en polyéthylène où l'on ajoute successivement : - 400 μ l de la suspension d'adipocytes, - 50 μ l de tampon KRH contenant des doses croissantes d'hGH (0.1 à 10.000 ng/ml) ou d'insuline (0.05 à 100 ng/ml), - 50 μ l de glucose tritié (D-[3- 3 H]glucose) contenant 50.000 à 100.000 dpm, dans un volume total de 0.5 ml. La concentration finale d'adipocytes est de 1 % (V/V) pour les expériences sur adipocytes de rats normaux et 2 % (V/V) sur adipocytes de rats hypox. Cette concentration est ramenée à 0.5 % (V/V) pour l'insuline. Les fioles sont incubées 2 heures à 37°C, sous agitation douce. L'incubation est interrompue par l'addition de 5 ml par tube d'une phase organique scintillante (1 L. de toluène + 0.3 gr dimethyl POPOP + 5 g PPO), les fioles sont fermées et agitées violemment pendant 30 secondes pour rompre les cellules. On laisse reposer 1 heure pour permettre l'extraction des lipides dans la phase organique. La radioactivité extraite dans la phase organique est mesurée dans un compteur bêta (Beckman LS1880). Le rendement de comptage est mesuré individuellement sur chaque échantillon par un programme de standardisation interne calibré sur des standards tritiés et le résultat est donné en dpm. La lipogenèse basale est obtenue en effectuant le test complet sans addition d'hGH ou d'insuline dans les tubes. La radioactivité non spécifique est obtenue en effectuant le test complet sans adipocytes et est soustraite de tous les résultats.

Les résultats obtenus illustrés dans la Figure 10, montrent l'effet insulinique que l'on obtient pour l'hormone de croissance hypophysaire naturelle, et

pour la hGH modifiée. Contrairement à l'hormone de croissance hypophysaire, la hGH modifiée n'induit aucune augmentation de la lipogenèse de base, même à des concentrations allant jusqu'à 10 µg/ml. Autrement dit, la hGH modifiée ne révèle aucune activité insulinique transitoire, bien que l'on se trouve dans un système carencé en hGH endogène.

Comme cette activité biologique de type insulinique a été mise en évidence pour d'autres hGH recombinantes, notamment la Met-hGH "Somatonorm" (Rapport KabiVitrum, 1985; Goodman, 1984), et la "Genotropin", dont la séquence est identique à celle de l'hormone naturelle (Flash d'informations médicales de KabiVitrum, 1987), on peut conclure que l'absence d'activité insulinique est le résultat direct de la délétion des deux premiers acides aminés.

Activité diabétogène de la hGH modifiée:

On a testé pour vérifier si la hGH modifiée ne présente pas d'activité diabétogène. Le test que l'on a utilisé consiste à mesurer la résistance contre l'insuline dans des chiens traités à l'hormone hGH modifiée comme décrit par ADER et al., 1987. Les résultats ont démontré que contrairement aux effets de résistance à l'insuline observés avec le standard hGH international, la hGH modifiée n'induisait aucune diminution de la sensibilité à l'insuline, durant une infusion chronique de 15 jours à basse dose (0.025 mg/kg/jour), ce qui prouve que l'hGH modifiée n'a pas d'activité diabétogène.

L'activité diabétogène de la hGH modifiée a aussi été testée sur adipocytes de rat. La stimulation du transport du glucose par l'insuline en présence ou en absence de la hGH modifiée a été mesurée et comparée à celle de la hGH naturelle. La hGH modifiée, contrairement à la hGH naturelle n'inhibe pas l'action

de l'insuline dans ce test, ce qui montre encore que la hGH modifiée n'a pas d'activité diabétogène.

LEGENDE DES FIGURES:

- Figure 1:

Séquence peptidique de l'hormone de croissance humaine (hGH).

NH₂ : extrémité aminoterminal.

COOH : extrémité carboxy terminale.

- Figure 2:

Schéma de la régulation et des activités biologiques de l'hormone de croissance humaine.

- Figure 3:

La séquence du cDNA hGH cloné dans le plasmide pDM 100 - hGH. Les codons des acides aminés de la hGH mature sont numérotés.

- Figure 4(a):

Schéma de la carte physique et de la structure génétique du plasmide d'expression pSOD.

SOD : DNA codant pour la superoxyde dismutase humaine.

- Figure 4(b):

La séquence du polylinker inséré à l'extrémité 3' du gène hSOD dans le vecteur pSOD.

- Figure 5:

Schéma de la construction du gène hGH modifié.

(a) La séquence de l'oligonucléotide synthétique utilisé pour modifier la séquence amino-terminale du gène hGH.

(b) La séquence des extrémités du fragment Xba I

- Sal I du cDNA hGH.

(c) La séquence des extrémités du fragment Nco I

- Sal I contenant le gène hGH modifié.

CDNA-hSOD : séquences appartenant au gène de la superoxyde dismutase humaine.

SD : séquence Shine-Delgarno.

- Figure 6:

Schéma de la construction du plasmide d'expression pSOD-hGH contenant le gène hGH modifié.

hGHM : DNA codant pour la protéine hGH modifiée.

cDNA-hSOP : DNA codant pour la superoxyde dismutase humaine.

- Figure 7 :

Schéma de la construction du plasmide d'expression pSGHD contenant un gène hSOD délété.

hGHM : DNA codant pour la protéine hGH modifiée.

cDNA-hSOD : DNA codant pour la superoxyde dismutase humaine.

- Figure 8(a) :

Analyse par PAGE-SDS 15 % des protéines totales, après induction [+] ou sans induction [-] à l'IPTG de l'expression du gène hGHM dans les souches E.coli D1210 (pSGHD). La flèche indique la protéine hGHM.

- Figure 8(b) :

Analyse par PAGE-SDS des protéines contenues dans les corps d'inclusion obtenus après induction à l'IPTG des souches E.coli D1210 (pSGHD). La flèche indique la protéine hGHM.

1. Extrait total des protéines bactériennes.

2. Extrait des protéines des corps d'inclusion purifiés.

- Figure 9:

Purification de la protéine hGHM solubilisée à partir des corps d'inclusion purifiés par chromatographie HPLC.

(a) Profil d'élution obtenu avec un gradient linéaire en NH_4HCO_3 , de 0.02 à 0.4 M.

(b) PAGE-SDS 15 % de chacun des pics élués par la chromatographie. La flèche indique la protéine hGHM.

- Figure 10:

Comparaison de l'activité insulinique du standard hGH international et de la hGH modifiée. Mesure de la

stimulation de la lipogénèse par la hGH dans l'adipocyte de rat préincubé pendant 4 heures dans un milieu sans hormone de croissance et incubé pendant 2 heures à 37°C en présence de D-[3-³H] glucose et de concentrations croissantes en hGH modifiée (*) ou hypophysaire (●). L'incorporation du glucose tritié (exprimée en pourcents de la lipogénèse de base) est mesurée en fonction de la dose d'hormone ajoutée.

BIBLIOGRAPHIE

- Birnbaum R.S. and Goodman H.M. (1976). Studies on the mechanism of the antilipolytic effect of growth hormone. *Endocrinology*. 99, 1336-1345.
- de Boer H.A., Comstock L.J. and Vasser M. (1983). The tac promoter : a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 21-25.
- Fain J.N., Kovacev V.P. and Scow R.O. (1965). Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. *J. Biol. Chem.* 240, 3522-3529.
- Goodman H.M. (1967). A comparative study of the effects of insulin and growth hormone on hexose metabolism in adipose tissue. *Endocrinology* 80, 45-52.
- Goodman H.M. (1968). Multiple effects of growth hormone on lipolysis. *Endocrinology* 83, 300-306.
- Goodman H.M. (1981). Separation of early and late responses of adipose tissue to growth hormone. *Endocrinology* 109, 120-129.
- Goodman H.M. (1984). Biological activity of bacterial derived human growth hormone in adipose tissue of hypophysectomized rats. *Endocrinology* 114, 131-135.
- Goodman H.M. and MacDonald R.J. (1979). Cloning of hormone genes from a mixture of cDNA molecules. *Methods Enzymol.* 68, 75-90.
- Hallewell R.A., Masiarz F.R., Najarian R.C., Puma J.P., Quiroga M.R., Randolph A., Sanchez-Pescador R., Scandella C.J., Smith B., Steimer K.S. and Mullenbach G.T. (1985). Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA : isolation of clones synthesising in high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res.* 13, 2017-2034.
- KabiVitrum workshop review (1985). Immunological aspects of human growth hormone (Milner R.D.G. and

Flodh H.). Use of extractive hGH in Europe (Job J.C.). Somatonorm.

- KabiVitrum Flash d'informations médicales (1987).
- Levine R. and Luft R. (1964). The relation between the growth and diabetogenic effects of the so-called growth hormone of the anterior pituitary. Diabetes 13,, 651-657.
- Martial J.A., Hallewell R.A., Baxter J.D. and Goodman H.M. (1979). Humang growth hormone : complementary DNA cloning and expression in bacteria. Science 205, 602-607.
- Merimee T.J., Rimpoin R.L. and Covalli-Sforza L.L. (1972). Metabolic studies in the african pygmy. J. Clin. Invest. 51, 395-401.
- Moody A.J., Stan M.A. and Stan M. (1975). A simple free fat cell bioassay for insulin. Horm. Metab. Res. 6, 12-16.
- Park C.R., Brown D.H., Cornblath M., Daughaday W.H. and Krah1 M.E. (1952). The effect of growth hormone on glucose uptake by the isolated rat diaphragm. J. Biol. Chem. 197, 151-153.
- Posner B.I., Kelly P.A., Shiu R.P.C. and Friesen H.G. (1974). Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding : tissue distribution, species variation and characterization. Endocrinology 95, 521-528.
- Greenspan S.S., Li C.H., Simpson M.E. and Evans H.M. (1949). Endocrinology 45, 455.
- Ader M., Agajanian T., Finegood D.T., and Bergman R.N. (1975). Endocrinology 120, 725- 730.

REVENDICATIONS

1. Hormone de croissance humaine modifiée témoignant d'une activité de stimulation de croissance somatidique caractérisée

- en ce qu'elle comporte une délétion des n premiers acides aminés N-terminaux de l'hormone de croissance humaine naturelle, n étant supérieur ou égal à 2 et n'allant pas au-delà de ce qui entraîne une modification de l'activité de stimulation de croissance somatidique par rapport à l'hormone de croissance naturelle humaine,

- et en ce qu'elle est dépourvue soit d'activité diabétogène, soit d'activité insulinique, agissant au niveau du métabolisme des carbohydrates, ou des deux activités à la fois,

- sous réserve que n soit différent de 13.

2. Hormone de croissance humaine modifiée selon la revendication 1, caractérisée en ce que le nombre n d'acides aminés délétés ne va pas au-delà de ce qui entraîne une modification de la configuration tridimensionnelle naturelle par rapport à l'hormone de croissance humaine naturelle.

3. Hormone de croissance modifiée caractérisée en ce qu'elle comporte une délétion des n premiers acides aminés N-terminaux de l'hormone de croissance humaine, n prenant l'une quelconque des valeurs 2 à 24, et étant différent de 13.

4. Hormone de croissance humaine modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 15.

5. Hormone de croissance humaine modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 14.

6. Hormone de croissance humaine modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 12.

7. Hormone de croissance humaine modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 9.

8. Hormone de croissance humaine modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 7.

9. Hormone de croissance humaine modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce que n prend l'une quelconque des valeurs de 2 à 5.

10. Hormone de croissance humaine modifiée selon la revendication 3, caractérisée en ce que n est égal à 2.

11. ADN recombinant codant pour la protéine modifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

12. Vecteur modifié par un insérat consistant en l'ADN recombinant selon la revendication 11, sous le contrôle d'un promoteur et des éléments de régulation appropriés permettant l'expression de cet ADN recombinant dans un hôte cellulaire compétent transformé par ledit vecteur recombinant.

13. Culture cellulaire transformée par le vecteur recombinant selon la revendication 12.

14. Procédé de production de l'hormone de croissance humaine modifiée selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 comprenant :

- la culture d'un hôte cellulaire compétent auparavant transformé avec un acide nucléique contenant une séquence de nucléotides codant pour la susdite protéine modifiée, elle-même placée sous le contrôle d'éléments de régulation, dont notamment un promoteur reconnu par les polymérases de cet hôte

cellulaire compétent, les éléments d'initiation et de terminaison de la traduction et

- la récupération de la protéine modifiée produite à partir des produits d'expression de cet hôte cellulaire.

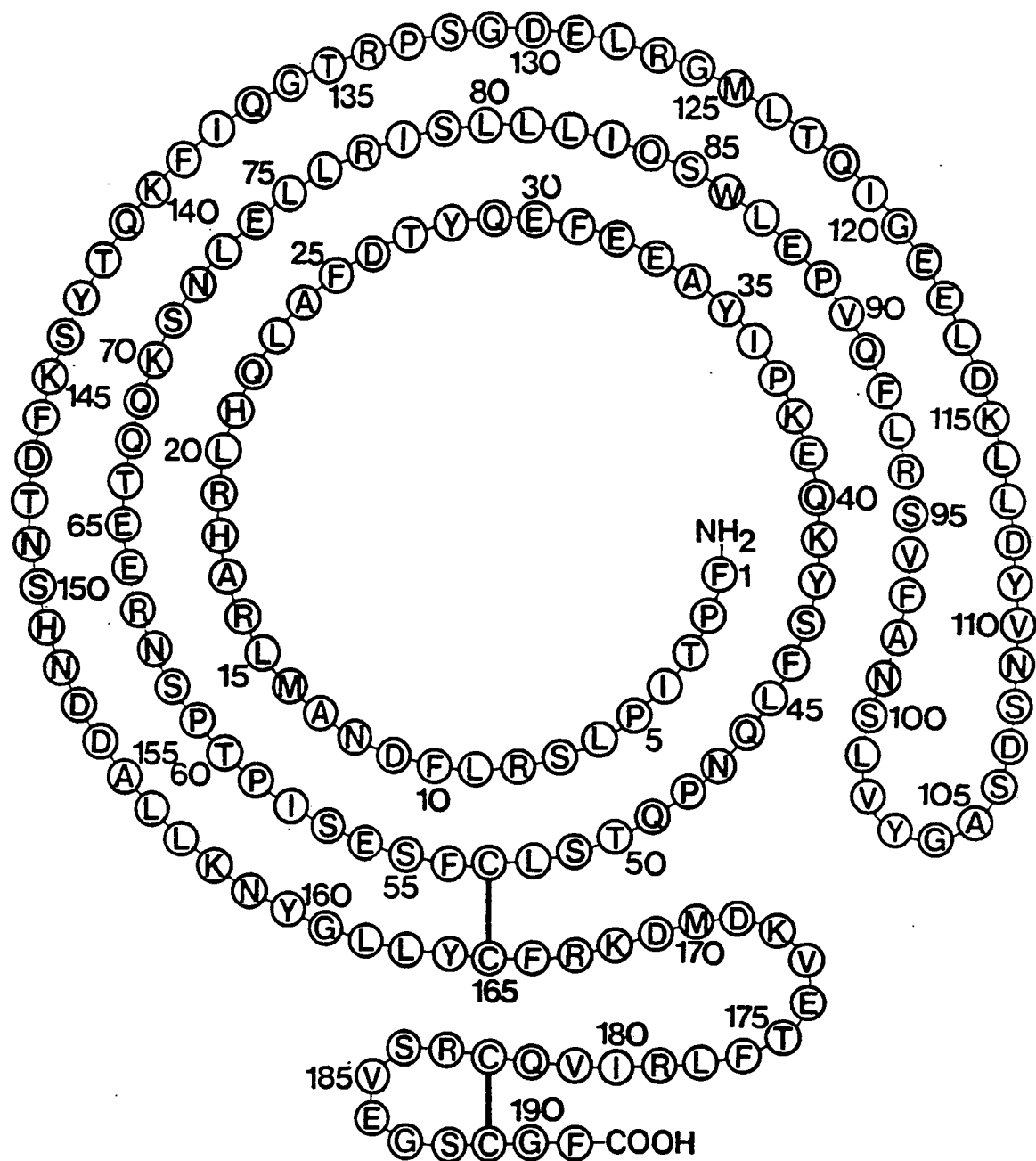
15. Composition pharmaceutique contenant comme principe actif l'hormone de croissance humaine modifiée selon l'une des revendications 1 à 10.

16. Utilisation de l'hormone de croissance selon l'une des revendications 1 à 10, à la préparation de médicaments destinés au traitement du déficit hypophysaire ou des carences en hormone de croissance, au traitement des retards ou des insuffisances de croissance, au traitement de l'obésité, au traitement de cicatrices après accident ou opération, au traitement des phénomènes de vieillissement, sans présenter d'effet diabétogène et/ou d'effet insulinique, notamment chez les patients cachexiques, les vieillards ou les nouveaux-nés.

17. Utilisation de l'hormone de croissance comportant une délétion des 13 premiers acides aminés N-terminaux de l'hormone de croissance humaine naturelle, à la préparation de médicaments destinés au traitement du déficit hypophysaire ou des carences en hormone de croissance, au traitement des retards ou des insuffisances de croissance, au traitement de l'obésité, au traitement de cicatrices après accident ou opération, au traitement des phénomènes de vieillissement, sans présenter d'effet diabétogène et/ou d'effet insulinique, chez les patients cachexiques, les vieillards ou les nouveaux-nés.

1/10

Fig. 1



A : Ala
D : Asp
G : Gly
V : Val
P : Pro
F : Phe

E : Glu
N : Asn
K : Lys
R : Arg
I : Ile
Y : Tyr

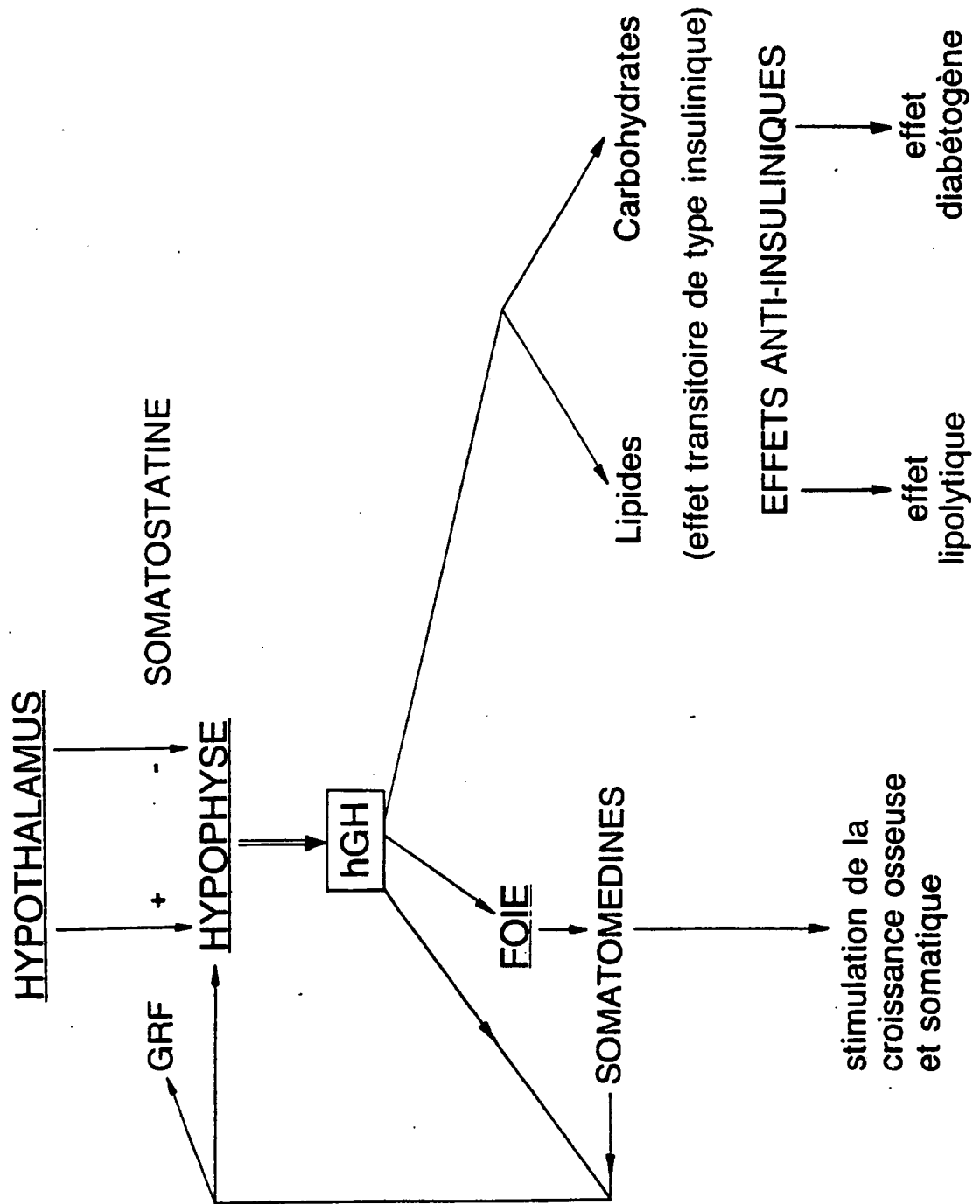
Q : Gln
L : Leu
S : Ser
T : Thr
M : Met
C : Cys

W : Trp
H : His

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2/10

Fig. 2



3/10/91
Fig. 3

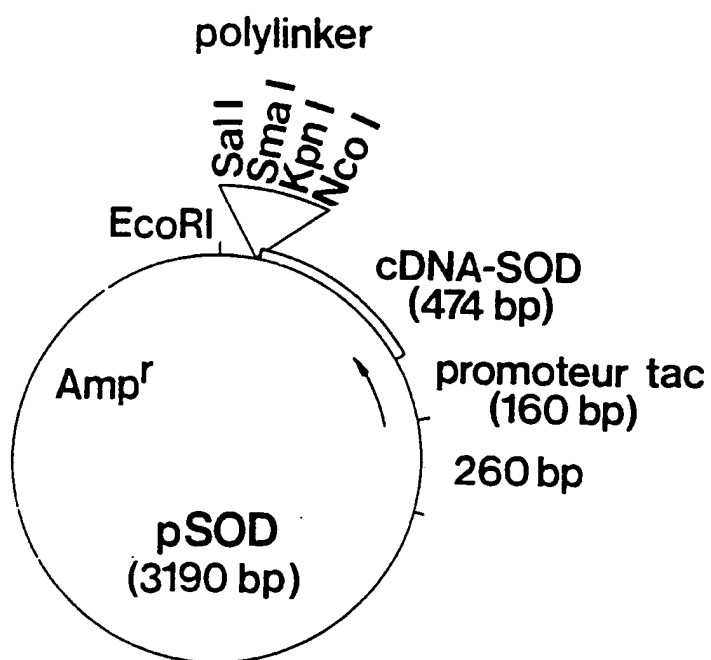
1	GAA	CCA	CTC	AGG	GTC	CTG	TGG	ACA	GCT	CAC	CTA	GCT	GCA	ATG	GCT	ACA	Met Ala Thr	3	48
4	Gly	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu	Cys	Leu	Pro		19	
49	GGC	TCC	CGG	ACG	TCC	CTG	CTC	CTG	GCT	TTT	GGC	CTG	CTC	TGC	CTG	CCC		96	
20	Trp	Leu	Gln	Glu	Gly	Ser	Ala	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu		35	
97	TGG	CTT	CAA	GAG	GGC	AGT	GCC	TTC	CCA	ACC	ATT	CCC	TTA	TCC	AGG	CTT		144	
36	Phe	Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	Phe		51	
145	TTT	GAC	AAC	GCT	ATG	CTC	CGC	GCC	CAT	CGT	CTG	CAC	CAG	CTG	GCC	TTT		192	
52	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Glu	Phe	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Lys		67	
193	GAC	ACC	TAC	CAG	GAG	GAG	TTT	GAA	GAA	GCC	TAT	ATC	CCA	AAG	GAA	CAG		240	
68	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro	Gln	Thr	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu		83	
241	TAT	TCA	TTC	CTG	CTG	CAG	AAC	CCC	CAG	ACC	TCC	CTC	TGT	TTC	TCA	GAG		288	
84	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	Leu		99	
289	ATT	CCG	ACA	CCC	TCC	AAC	AGG	GAG	GAA	ACA	CAA	CAG	AAA	TCC	AAC	CTA		336	
100	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	Leu	Glu	Pro		115	
337	GAG	CTG	CTC	CGC	ATC	TCC	CTG	CTG	CTC	ATC	CAG	TCG	TGG	CTG	GAG	CCC		384	
116	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala		131	
385	GTG	CAG	TTC	CTC	AGG	AGT	GTC	TTC	GCC	AAC	AGC	CTG	GTG	TAC	GGC	GCC		432	
132	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	Ile		147	
433	TCT	GAC	AGC	AAC	GTC	TAT	GAC	CTC	CTA	AAG	GAC	CTA	GAG	GAA	GGC	ATC		480	

3/10/2
Fig. 3 (suite)

148	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	163
481	CAA	ACG	CTG	ATG	GGG	AGG	CTG	GAA	GAT	GGC	AGC	CCC	CGG	ACT	GGG	CAG	528
164	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	179
529	ATC	TTC	AAG	CAG	ACC	TAC	AGC	AAG	TTC	GAC	ACA	AAC	TCA	CAC	AAC	GAT	576
180	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	Asp	195
577	GAC	GCA	CTA	CTC	AAG	AAC	TAC	GGG	CTG	CTC	TAC	TGC	TTC	AGG	AAG	GAC	624
196	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	Arg	Ser	Val	211
625	ATG	GAC	AAG	GTC	GAG	ACA	TTC	CTG	CGC	ATC	GTG	CAG	TGC	CGC	TCT	GTG	672
212	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe	***	CTG	CCC	GGG	TGG	CAT	CCC	TGT	GAC	CCC	720
673	GAG	GGC	AGC	TGT	GGC	TTC	TAG	CTG	CTG	CTG	GCC	ACT	CCA	GTG	CCC	ACC	768
721	TCC	CCA	GTG	CCT	CTC	CTG	GCC	CTG	GAA	GTT	GCC	ACT	CCA	GTG	CCC	ACC	768
769	AGC	CTT	GTC	CTA	ATA	AAA	TTA	AGT	TGC	ATC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	A

4/10/1

Fig. 4a



4/10/2
Fig. 4b

5'	G	ATC	GCC	ATG	GGT	ACC	CGG	GTC	GAC	TAA	ATG	ACT	AG	3'
3'			CGG	TAC	CCA	TGG	GCC	CAG	CTG	ATT	TAC	TGA	TCT	5'
			NcoI		KpnI		SmaI		Sall					

5/10/11
Fig. 5

a. DNA synthétique

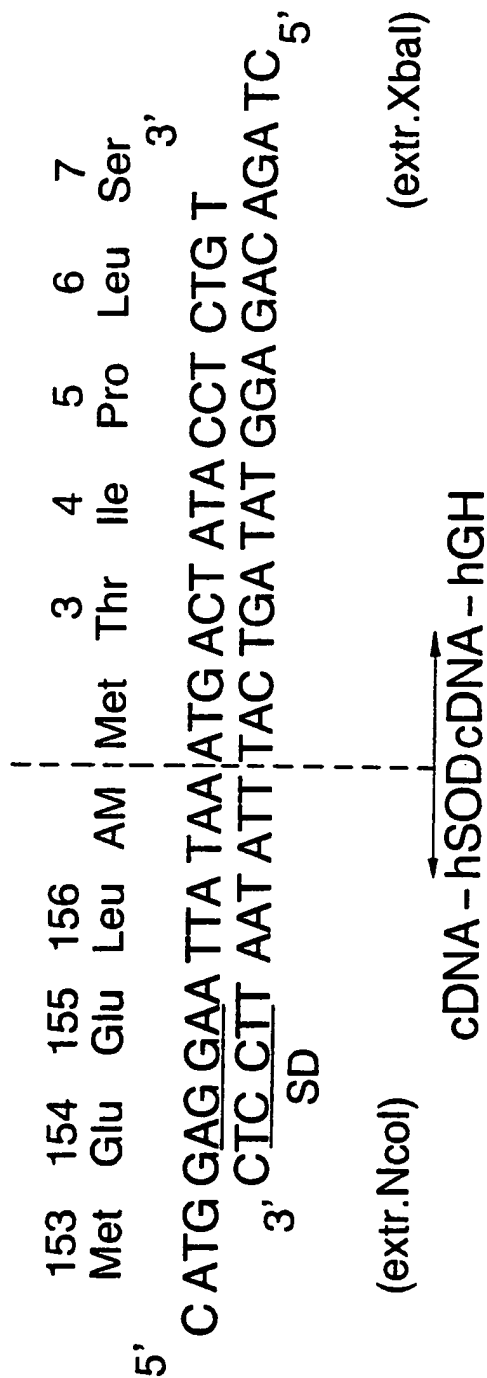
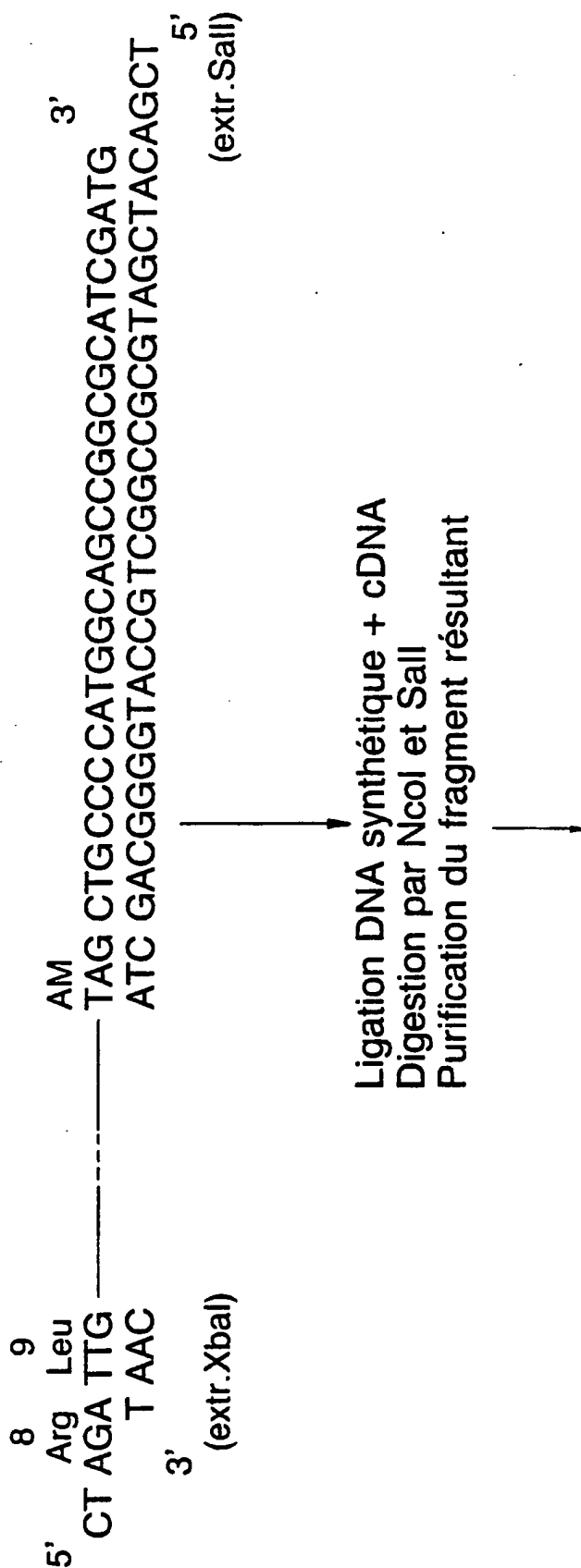


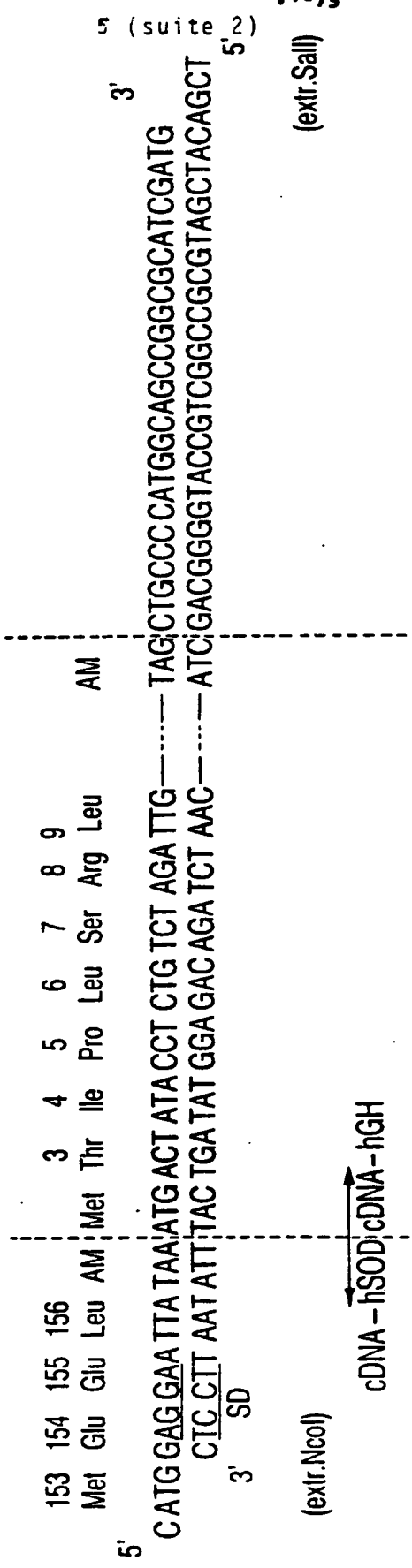
Fig. 5 (suite 1)

b. Fragment de cDNA - hGH (580 bp)



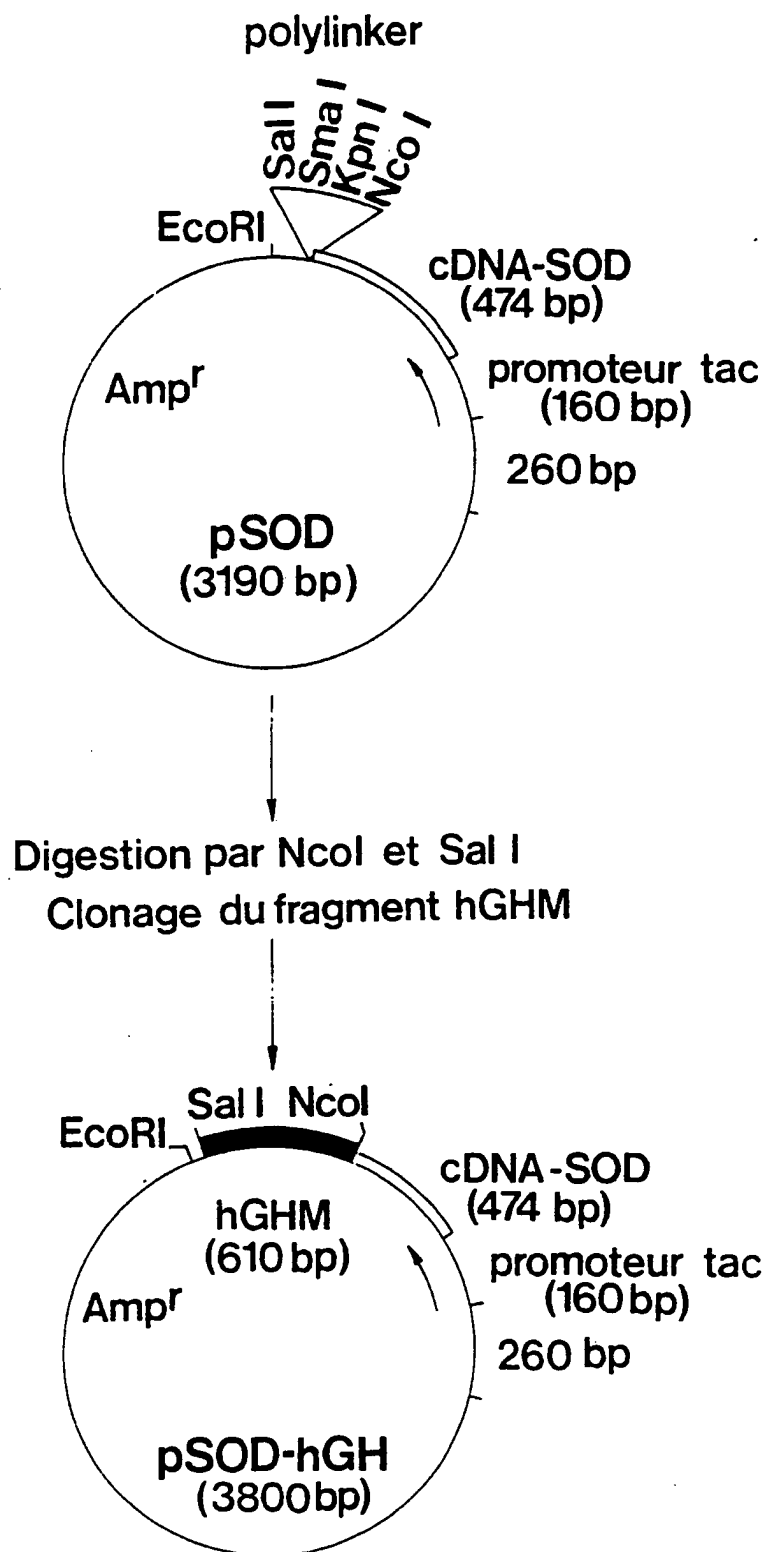
5/10/3

c. Fragment contenant le gène hGH modifié

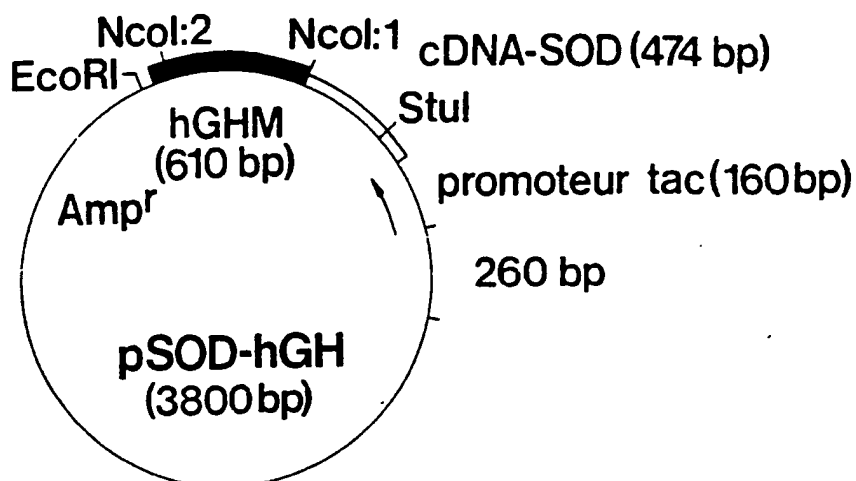


6/10

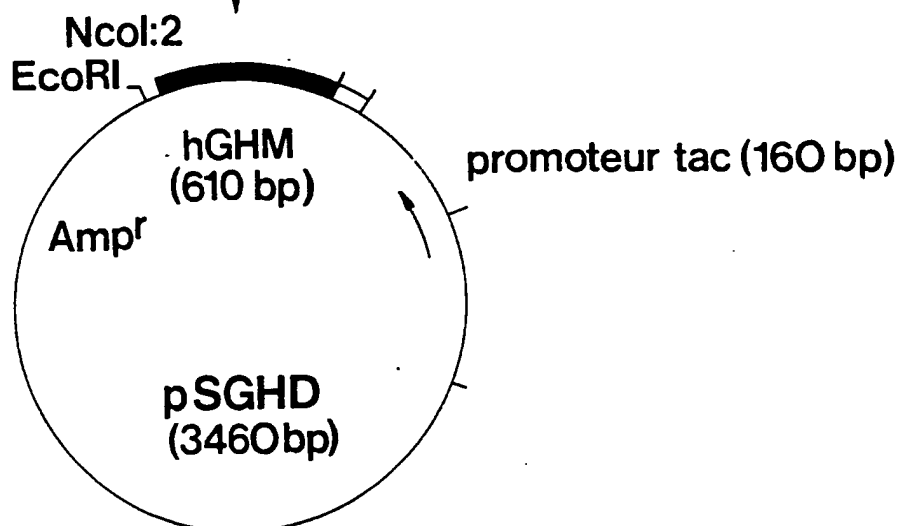
Fig. 6



7/10
Fig. 7



Digestion partielle par NcoI
Digestion complète par StuI
Purification du fragment [StuI - NcoI : 1] (3460 bp)
Klenow + dNTPs
T₄ - DNA ligase



8/10

Fig. 8a

Fig. 8b

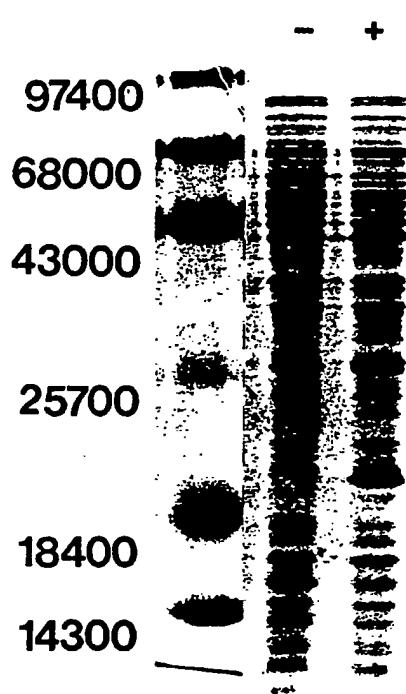
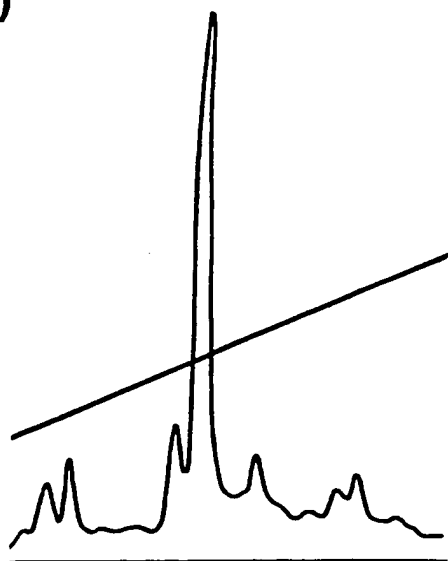


Fig. 9

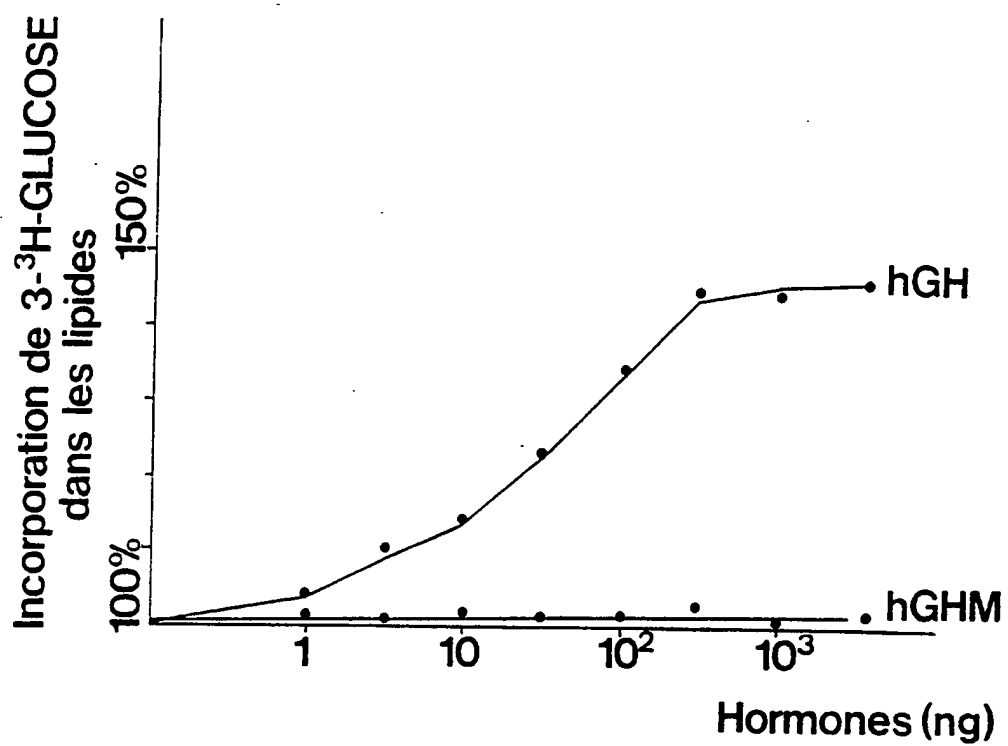
(a)



(b)



10/10
Fig. 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP89/01399

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁸		
According to international Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl.5 C12N 15/18; C07K 13/00; A61K 37/36; C12N 1/21		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System ¹	Classification Symbols	
Int.Cl.5	C12N, A61K, C07K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁶		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁵		
Category ³	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP, A, 0131843 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.) 23 January 1985; see page 21, line 30- page 22, line 10; example 3; claims 16,20,26,36,45,49,59, 63,67	17
Y	----	1-16
Y	EP, A, 0104920 (BIOGEN N.V.) 4 April 1984; see the whole document	1-16
Y	EP, A, 0103395 (BIOGEN N.V.) 21 March 1984 see the whole document	1-16
A	EP, A, 0220958 (ELI LILLY AND CO.) 6 May 1987; see page 18, line 1- page 19 line 35; claims 1,4,6,9	1,10
X	WO, A, 86/05804 (NORDISK GENTOFTE) 9 October 1986; see page 7, line 22- page 9, line 12 -----	11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
23 February 1990 (23.02.90)	3 April 1990 (03.04.90)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 8901399

SA 32408

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 26/03/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0131843	23-01-85	AU-A- 1977788	22-12-88
		AU-B- 577298	22-09-88
		AU-A- 3034584	17-01-85
		CA-A- 1254527	23-05-89
		EP-A- 0319049	07-06-89
		JP-A- 60091986	23-05-85
		US-A- 4871835	03-10-89
		US-A- 4831120	16-05-89
EP-A- 0104920	04-04-84	AU-B- 575784	11-08-88
		AU-A- 1933183	05-04-84
		JP-A- 59173083	29-09-84
EP-A- 0103395	21-03-84	AU-B- 568597	07-01-88
		AU-A- 1802183	23-02-84
		CA-A- 1224432	21-07-87
		JP-A- 59063197	10-04-84
		US-A- 4693973	15-09-87
EP-A- 0220958	06-05-87	AU-A- 6441486	30-04-87
		JP-A- 62106100	16-05-87
		SU-A- 1531858	23-12-89
		US-A- 4782139	01-11-88
WO-A- 8605804	09-10-86	AU-A- 5695086	23-10-86
		EP-A- 0218651	22-04-87
		JP-T- 62502657	15-10-87

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/EP 89/01399

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB ⁵ : C 12 N 15/18, C 07 K 13/00, A 61 K 37/36, C 12 N 1/21		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 12 N, A 61 K, C 07 K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	EP, A, 0131843 (BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORP.) 23 janvier 1985 voir page 21, ligne 30 - page 22, ligne 10; exemple 3; revendications 16,20,26,36,45,49,59,63,67	17
Y	--	1-16
Y	EP, A, 0104920 (BIOGEN N.V.) 4 avril 1984 voir document en entier	1-16
Y	EP, A, 0103395 (BIOGEN N.V.) 21 mars 1984 voir document en entier	1-16
	--	./.
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
23 février 1990	03 APR 1990	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé T.K. WILLIS	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	EP, A, 0220958 (ELI LILLY AND CO.) 6 mai 1987 voir page 18, ligne 1 - page 19, ligne 35; revendications 1,4,6,9 --	1,10
X	WO, A, 86/05804 (NORDISK GENTOFTE) 9 octobre 1986 voir page 7, ligne 22 - page 9, ligne 12 -----	11

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

EP 8901399

SA 32408

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/03/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0131843	23-01-85	AU-A- 1977788	22-12-88
		AU-B- 577298	22-09-88
		AU-A- 3034584	17-01-85
		CA-A- 1254527	23-05-89
		EP-A- 0319049	07-06-89
		JP-A- 60091986	23-05-85
		US-A- 4871835	03-10-89
		US-A- 4831120	16-05-89
EP-A- 0104920	04-04-84	AU-B- 575784	11-08-88
		AU-A- 1933183	05-04-84
		JP-A- 59173083	29-09-84
EP-A- 0103395	21-03-84	AU-B- 568597	07-01-88
		AU-A- 1802183	23-02-84
		CA-A- 1224432	21-07-87
		JP-A- 59063197	10-04-84
		US-A- 4693973	15-09-87
EP-A- 0220958	06-05-87	AU-A- 6441486	30-04-87
		JP-A- 62106100	16-05-87
		SU-A- 1531858	23-12-89
		US-A- 4782139	01-11-88
WO-A- 8605804	09-10-86	AU-A- 5695086	23-10-86
		EP-A- 0218651	22-04-87
		JP-T- 62502657	15-10-87

EP0 FORM 10072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82